

神経分泌細胞からの伝達物質放出を媒介するタンパク質の研究

Studies on the proteins that mediate the release of neurotransmitters

代表研究者 大阪大学産業科学研究所助手 多賀谷 光 男
Res. Assoc., Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka Univ.
Mitsuo TAGAYA

N-Ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) was initially identified as a factor that mediates intra-Golgi protein transport in a cell-free system. We cloned brain NSF and revealed its localization. Human brain NSF had 744 amino acid residues with 97% identity to Chinese hamster ovary NSF. Most replacements were found at the amino-terminal region. Immunostaining with a monoclonal anti-NSF antibody (2E5) showed that an NSF-like protein is predominantly localized in the molecular layer where synaptic vesicles are present. Purification and electron microscopic analysis revealed that the NSF-like protein is associated with rat brain synaptic vesicles. Immunoblotting showed that NSF-like proteins are associated with brain synaptic vesicles from various sources.

NSF has two homologous nucleotide-binding regions, each containing the consensus sequence for the nucleotide-binding. To elucidate the role of the two nucleotide-binding regions, lysyl residues (Lys-266 and Lys-549) in the consensus sequences were replaced by Gln or Met *via* site-directed mutagenesis. Lys-266 mutant proteins had no protein transport activity, whereas Lys-549 mutant proteins had 1-2% transport activity of the wild-type protein. On the other hand, Lys-266 and Lys-549 mutant proteins showed 15-25% ATPase activity of the wild-type protein. Lys-266 mutant proteins inhibited protein transport in an NEM-sensitive manner. This inhibition was protected by addition of excess wild-type NSF. Monoclonal anti-NSF antibodies and mutant NSF proteins may be useful for testing the involvement of NSF in the secretion of neurotransmitters.

研究目的

ペプチドホルモンなどの分泌タンパク質は粗面小胞体上で合成されつつ小胞体に挿入され、ゴルジ体を経て細胞外へと分泌される。小胞体からゴルジ体、ゴルジ体内、ゴルジ体から細胞膜へのタンパク質輸送はそれぞれのオルガネラをつなぐ小胞によって媒介されている。一方、カテコールアミンなどの神経伝達物質はシナプス小胞と呼ばれる小胞に蓄積し、神経刺激に伴って開口分泌と呼ばれるシナプス小胞と細胞膜の融合によって細胞外へと放出される。ペプチドホルモンや神経伝達物質の放出機構を解明するためには小胞輸送、特に小胞の細胞膜との融合機構を明らかにしなければならない。*N*-エチルマレイミド感受性因子 (*N*-ethylmaleimide-sensitive factor: 以下 NSF と

略す) は最初ゴルジ体内小胞輸送の膜融合に関与する因子として発見されたタンパク質であるが、その後小胞体からゴルジ体への輸送、またエンドソームの融合にも関与することが明らかとなったサブユニット分子量 83,000 (SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動上では 76,000) の ATPase 活性を持つ四量体タンパク質である。本研究の目的は (I) 神経分泌細胞からの神経伝達物質の放出機構における NSF の役割の解明。 (II) 部位特異的変異導入と化学修飾による NSF の構造と機能の解明である。

研究経過および研究成果

- (I) 神経分泌細胞からの神経伝達物質の放出機構における NSF の役割の解明について
 - (i) 分泌小胞に NSF が存在することの証明

NSF はチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞から 1988 年に単離され、翌年 cDNA がクローニングされた。単離時に CHO 細胞の NSF に対する抗体が作成されたが、ウエスタンブロッティングや免疫組織化学の実験に使用できる抗体ではなかった。そこで、NSF の大腸菌での発現系を作成して NSF を mg オーダーで精製し、モノクローンおよびポリクローン抗体を作成した。モノクローン抗体 (2E5) はラット脳ホモジネート中の 76 kDa のタンパク質 (以下 NSF 様タンパク質と呼ぶ) のみと反応したので、この抗体を用いてラット小脳内の NSF 様タンパク質の分布を調べた。その結果、NSF 様タンパク質は主に小脳の分子層と顆粒層の糸球体に分布しており、この分布はシナプス小胞の分布と一致していた。また、NSF 様タンパク質はプルキンエ細胞のデンドライトの周囲に存在していたが、プルキンエ細胞の細胞体およびデンドライトどちらにも存在していなかった。細胞体にはゴルジ体が存在しているので NSF は存在するはずであるが、免疫化学染色で細胞体は染まらなかった。このことは NSF のゴルジ体における存在量が神経繊維における NSF の存在量に比べて少ないことを示唆している。NSF がシナプス小胞に存在することを確かめるためにシナプス小胞を精製してウエスタンブロッティングを行った。シナプス小胞精製の最終段階であるゲルろ過において、NSF はシナプス小胞と同じ分画に溶出された。ウエスタンブロッティングの結果、NSF のシナプス小胞における含量は全タンパク質の約 0.5% であることがわかった。CHO 細胞のゴルジ体における NSF の含量は約 0.25% であるので、シナプス小胞において NSF はゴルジ体よりも濃縮されていると考えられた。さらに、電子顕微鏡を用いて NSF がシナプス小胞に結合していることを確認した。他の動物起源のシナプス小胞に NSF が存在するかどうかを調べたところ、牛、豚、カエルから単離したシナプス小胞に NSF 様タンパク質は存在していた。

NSF は膜結合に膜表在性タンパク質である SNAP を必要とすることがわかっていたが、今回

の研究中に米国の Rothman らは SNAP の膜内性受容体が SNAP-25 や VAMP であることを明らかにした。これらのタンパク質はいずれもシナプス小胞のタンパク質であり、NSF がシナプス小胞に存在するという我々の結果と一致する。

(II) NSF の構造と機能に関する研究について

(i) 分泌細胞の NSF のクローニング

NSF は CHO 細胞と酵母由来のものしかクローニングされていない。NSF はシナプス小胞やゴルジ体に存在することから isoform が存在する可能性もあると考え、ヒト脳の cDNA ライブラリを CHO 細胞由来 NSF の cDNA を用いてスクリーニングした。まず、CHO 細胞 NSF のカルボキシル末端に相当する DNA 断片を用いてスクリーニングした。モノクローン抗体 2E5 は NSF のカルボキシル末端由来の 31 kDa の断片を認識し、この抗体で種々の起源のシナプス小胞の NSF が認識されることからカルボキシル末端は種を越えてよく保存されていると考えられる。このスクリーニングによって 2.4 kb の DNA を含む三つのポジティブクローンが得られた。DNA 構造解析の結果、この断片は NSF の全領域を含んでいなかったため、CHO 細胞 NSF のアミノ末端と中央部に相当する DNA 断片を用いてもう一度スクリーニングした。1.5 kb の DNA を含む四つのポジティブクローンを得たが、これらのクローンも全領域を含んでおらず、また先に得た 2.4 kb 断片と重複していなかった。そこで他の cDNA ライブラリを用いて両者の重複を確認した。予想されるヒト脳の NSF のアミノ酸配列を CHO 細胞の NSF と比較したところ、両者共に 744 残基のアミノ酸からなり、97% のアミノ酸が同一であった。NSF にはアミノ末端領域とそれに続く二つの相同なヌクレオチド結合領域が存在する。それぞれの領域におけるアミノ酸の置換はアミノ末端領域では 202 残基中 16 ヶ所、第一のヌクレオチド結合領域では 284 残基中 2 ヶ所、第二のヌクレオチド結合領域では 258 残基中 1 ヶ所であった。二つのヌクレオチド結合領域の保存性がよいことは、それらがこのタンパク質において重要な役割をしているためであろう。また

第二のヌクレオチド領域がほぼ完全に保存されていたことはこの領域を認識する抗体 (2E5) が種々の起源の NSF を認識することとよく合う。

(ii) NSF の部位特異的変異導入

NSF の二つの相同なヌクレオチド結合領域には Gly-X-X-X-Gly-Lys-Thr というヌクレオチド結合のコンセンサス配列が存在する (Gly-260 から Thr-267 と Gly-543 から Thr-550)。この配列の役割を調べるために部位特異的変異導入によって Lys-266 と Lys-549 をそれぞれグルタミンとメチオニンに変換した。Lys-266 の変異タンパク質はゴルジ体内タンパク質輸送活性を完全に失っていたが、Lys-549 の変異タンパク質は野生型に比べて 1~2% の活性を有していた。Lys-266 と Lys-549 の変異タンパク質は野性型の 15~25% の ATPase 活性を有していたことから、両ヌクレオチド結合部位は協調して ATP の加水分解を行っていると考えられた。また、Lys-266 の変異タンパク質はゴルジに存在する野性型の NSF と競合し、ゴルジ体内タンパク質輸送を阻害することがわかった。変異タンパク質を *N*-エチルマレイミドで処理するとこの阻害活性は失われ、また過剰量の野性型 NSF を加えると保護効果が見られることから、この阻害は特異的な阻害である。過剰量の野性型 NSF を加える時間を変えて、どの段階で阻害を抑える効果がなくなるかを調べたところ、小胞がいったん生成すると保護効果が見られなくなることがわかった。この結果は NSF が小胞の生成と共に小胞に取り込まれ、小胞に取り込まれた NSF は外から加えた NSF と交換しなくなると考えると上手く説明できる。事実、シナプス小胞に存在する NSF はゴルジ膜に存在する NSF よりも膜に強く結合していた。

今後の課題と発展

当初、PC12 細胞におけるカテコールアミン放出への NSF の関与を調べることを予定していたが、残念ながら 1992 年度は全く手つかずに終わってしまった。現在、この実験を進めるために PC12 細胞からのカテコールアミンの放出のアッセイ系を確立しようとしている。今回の研究によって NSF に対するいくつかのモノクローン抗

体や、輸送を阻害する変異 NSF を作成することができたので、それらをマイクロインジェクションすることでカテコールアミンの放出が阻害されるかどうかを明らかにしたいと思っている。

去年、Burgoyne らは EXO I (後にホスホリパーゼ A₂ であることが判明) というタンパク質が PC12 細胞からのカテコールアミン放出を活性化することを見いだした。我々はゴルジ体内タンパク質輸送のアッセイ系を用いての輸送阻害剤の検索中に、ホスホリパーゼ A₂ の阻害剤が輸送を阻害することを見いだした。現在、ホスホリパーゼ A₂ 阻害剤が *in vivo* において小胞体からゴルジ体への輸送、ゴルジ体から小胞体への逆輸送、さらにゴルジ体から細胞質膜への輸送も阻害することを明らかにしつつあり、このタンパク質も NSF と同様に小胞輸送の共通な装置であると考えられる。ホスホリパーゼ A₂ はホスホリピドの sn-2 位のエステル結合を切断する酵素であるが、この酵素がどのように小胞の融合を促進するのかを明らかにすることは重要であると考えられる。

発表論文リスト

論文

- 1) Kagiwada, S., Murata, M., Hishida, R., Tagaya, M., Yamashina, S. and Ohnishi, S.: *In vitro* fusion of rabbit liver Golgi membranes with liposomes. *J. Biol. Chem.*, 268, 1430-1435 (1993).
- 2) Tagaya, M., Wilson, D. W., Brunner, M., Arango, N. and Rothman, J. E.: Domain structure of an *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein involved in vesicular transport. *J. Biol. Chem.*, 268, 2662-2666 (1993).
- 3) Tagaya, M., Henomatsu, N., Yoshimori, T., Yamamoto, A., Tashiro, Y. and Fukui, T.: Correlation between phospholipase A₂ activity and intra-Golgi protein transport reconstituted in a cell-free system. *FEBS Lett.*, 324, 201-204 (1993).

総説

- 1) 多賀谷光男:「ゴルジ体内小胞輸送」生化学, 64, 1272-1277 (1992).
- 2) 吉森 保, 多賀谷光男, 山本章嗣, 田代 裕:「小胞輸送と選別の分子機構: 真核細胞の分泌経路」蛋白質・核酸・酵素, 38, 927-938 (1993).